

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-118142

(43)公開日 平成7年(1995)5月9日

(51) Int.Cl.	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A61K 9/127	D			
C07F 9/10	Z 9155-4H			
G01N 27/333				
27/327				
		G01N 27/30	331	N
	審査請求	未請求	請求項の数 4	OL (全5頁) 最終頁に続く

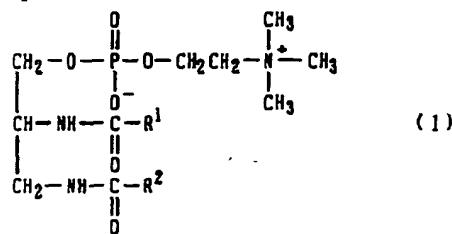
(21)出願番号	特願平5-260024	(71)出願人	000000918 花王株式会社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
(22)出願日	平成5年(1993)10月18日	(72)発明者	中村 幹彦 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606

(54)【発明の名称】味覚関与蛋白質抽出剤

## (57)【要約】

【構成】 下記一般式(1)

【化1】



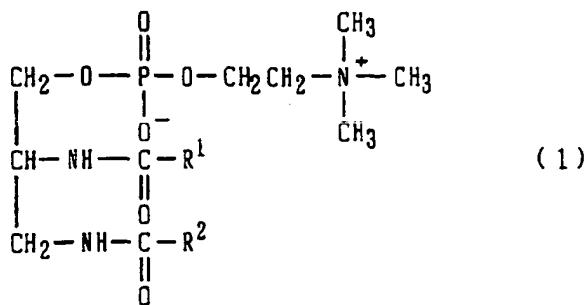
(式中、R' 及びR' は炭素数8~24のアルキル又はアルケニル基を示す)で表わされるアミド結合を有するホスファチジルコリンを含むリボソーム懸濁液からなる味覚関与蛋白質抽出剤。

【効果】 舌上の甘味、うまみ等の発現に関与する味覚関与蛋白質を容易に抽出することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(1)

【化1】

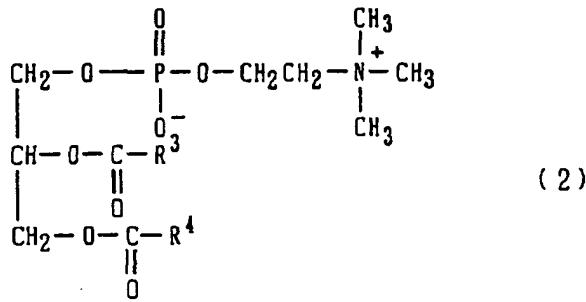


10

(式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は炭素数8~24のアルキル又はアルケニル基を示す)で表わされるアミド結合を有するホスファチジルコリンを含むリボソーム懸濁液からなる味覚関与蛋白質抽出剤。

【請求項2】 更に、リボソーム懸濁液が次の一般式(2)

【化2】



20

(式中、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>は炭素数8~24のアルキル又はアルケニル基を示す)で表わされるホスファチジルコリンを含むものである請求項1記載の味覚関与蛋白質抽出剤。

【請求項3】 請求項1又は2記載の味覚関与蛋白質抽出剤を舌上皮表面に接触させることを特徴とする舌上皮表面に顕在する味覚関与蛋白質を抽出する方法。

【請求項4】 請求項1又は2記載の味覚関与蛋白質抽出剤を舌上皮表面に接触させる前後で舌咽神経の電位変化を測定することを特徴とする味覚感受性変化の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、舌上に顕在し、甘味、うまみ等の発現に重要な役割を演じている味覚関与蛋白質を抽出することができ、舌の味覚感受性を変化せしめることができる味覚関与蛋白質抽出剤及びこれを用いた抽出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 舌上の味細胞を刺激する物質としては、

酸、塩、苦味物質、甘味物質、うまみ物質(アミノ酸)等が知られている。このうち、塩味、酸味、苦味はこれらの原因物質が舌上脂質膜へ作用して発現する味と言われている。例えば、苦味物質と舌上脂質膜への関係について、アゾレクチンリボソームの各種苦味物質に対する応答閾値と人間の味覚閾値とが良い相関性を示すことから、味細胞における苦味物質の受容サイトは、脂質2分子膜と同様な疎水性部位であることが判っている〔膜(MEMBRANE), 13(3), 144-151, (1988)〕。

【0003】 この知見に基づき、苦味物質、酸、塩については、一般的な脂質2分子膜を利用し、研究が進められている。

【0004】 一方、甘味、うま味については、舌を蛋白質分解酵素で処理すると神経応答が消失することから、甘味物質、うま味物質に特異的な受容蛋白質が介して応答が発現していると考えられている。

【0005】 しかしながら、この舌上蛋白質は、舌表面に存在し、更に膜蛋白質であることから抽出が困難であり、研究はあまり進んでいない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 従って、蛋白質分解酵素を使用する場合を除いて、甘味、うま味物質についての舌の味覚感受性を変化せしめることは、困難であった。よって、本発明の目的は、味覚関与蛋白質を抽出する方法を提供し、舌の味覚感受性に変化を与え、甘味物質等の摂取調節等に役立てようとするものである。

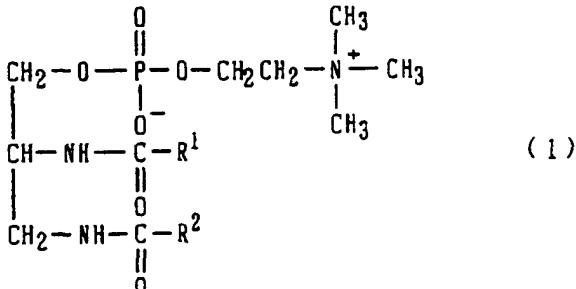
【0007】

【課題を解決するための手段】 斯かる実情に鑑み本発明者らは鋭意研究を行なった結果、下記一般式(1)で表わされるホスファチジルコリンを含むリボソーム懸濁液を舌上に接触させれば、味覚関与蛋白質が抽出でき、抽出後、甘味、うま味に関する味覚が減少することを見出し本発明を完成した。

【0008】 すなわち本発明は、下記一般式(1)

【0009】

【化3】



40

【0010】 (式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は炭素数8~24のアルキル又はアルケニル基を示す)で表わされるアミド結合を有するホスファチジルコリンを含むリボソーム懸

50

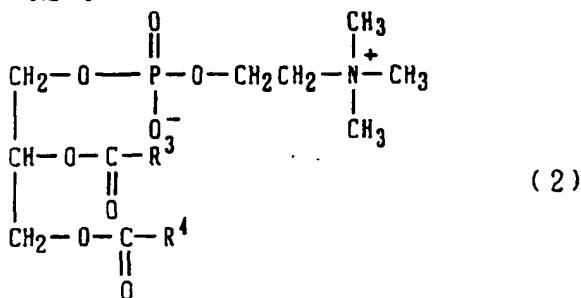
濁液からなる味覚閾与蛋白質抽出剤を提供するものである。また、本発明は当該味覚閾与蛋白質抽出剤を舌上皮表面に接触させることを特徴とする舌上皮表面に顕在する味覚閾与蛋白質を抽出する方法を提供するものである。更にまた本発明は当該味覚閾与蛋白質抽出剤を舌上皮表面に接触させる前後で舌咽神経の電位変化を測定することを特徴とする味覚感受性変化の測定方法を提供するものである。

【0011】本発明で用いる一般式(1)で表わされるアミド結合を有するホスファチジルコリンのR'及びR'で示されるアルキル又はアルケニル基の炭素数は8～24であるが、特に10～20のものが好ましい。具体的にはラウロイル基、ミリストイル基、パルミトイル基等が好ましい。特に好ましいアミド結合を有するホスファチジルコリンとしてはDDPC(1,2-ジミリストイルアミド-1,2-デオキシホスファチジルコリン)が挙げられる。また、アミド結合を有するホスファチジルコリン(1)は、特開昭61-267509号公報に記載の方法により製造することができる。

【0012】本発明におけるリボソーム懸濁液は、このホスファチジルコリン(1)と通常のリボソーム形成用リン脂質より、公知の方法、例えば代表的にはボルテックス法(Vortexing method又はHydration method)(Bangham, A. D., Standish, H. H. & Hatkin, J. C. J. Hol. Biol., 13, 238 (1965)]に従って製造することができる。上記リボソーム形成用リン脂質としては、より具体的には例えば、大豆、卵黄等から抽出、精製されたレシチン、スフィンゴミエリン等の脂質、極性頭部近くにジペプチド結合を有する合成脂質が挙げられるが、次の一般式(2)

【0013】

【化4】



【0014】(式中、R'及びR'は炭素数8～24のアルキル又はアルケニル基を示す)で表わされるホスファチジルコリン、例えば、卵黄レシチン、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)等が好ましい。

【0015】アミド結合を有するホスファチジルコリン(1)と通常のリボソーム形成用リン脂質の好ましい組合せとしては、DDPCと卵黄レシチン又はDDPCと

10

20

30

40

50

DMPCとを約4:6(モル比)としたものが挙げられる。上記の如くして得られたりボソーム懸濁液は、味覚閾与蛋白質抽出剤として用いることができる。

【0016】この抽出は、上記リボソーム懸濁液を舌上皮表面に接触させることにより実施することができる。具体的にはリボソーム懸濁液を舌上に繰り返し注げばよい。ここで適用される舌は、動物の舌及び味覚発現に蛋白が関与する味覚器であるが、本発明では、哺乳類、両生類、爬虫類、鳥類及び魚類の舌が特に好ましい。また、舌に対するリボソーム懸濁液の使用量は、抽出蛋白質量に関して非常に重要であり例えば、牛蛙一頭の舌に対してもリボソーム懸濁液1ml中にDDPC:DMPC=4:6が5mg含まれる液を10ml添加するのが好ましく、ヒトではDDPC:DMPC=4:6が15～45mg含まれる液を30ml添加するのが好ましい。

【0017】上記の如くして抽出された味覚閾与蛋白質は、活性を保持したままリボソーム上に再構築されており、これは味覚及び味覚閾与蛋白質研究、例えば人工膜味センサー等として利用できる。

【0018】また、本発明のリボソーム懸濁液と舌上皮表面を接触させる前後で、舌咽神経の電位変化を測ることにより味覚感受性の変化を測定することができる。本発明のリボソーム懸濁液は、例えばうがい剤として食事前に使用することにより、塩及び苦味が強く感じられるようになるので、食品中の食塩を減らすことができ、更に、甘さを感じなくなるため、甘味食品がますくなるので甘味食品の摂食を阻害することができるという応用面も考えられる。

【0019】

【発明の効果】本発明の味覚閾与蛋白質抽出剤は、舌上の甘味、うまみ等の発現に関与する味覚閾与蛋白質を容易に抽出することができ、また、得られた抽出物は味覚閾与蛋白の研究に用いることができる。更に本発明の味覚閾与蛋白質抽出剤を舌上皮表面に接触させる前後で舌咽神経の電位変化を測定することにより味覚感受性の変化を知ることができる。一方、本発明の味覚閾与蛋白質抽出剤は、うがい薬等に配合することにより、舌の味覚感受性を変化させることができ、甘味物質摂食抑制等の効果も期待できる。

【0020】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが本発明は、これらに限定されるものではない。

【0021】実施例1

卵黄から文献記載の方法[W. S. Singleton, H. S. Gray, H. L. Brown, J. L. White, J. Am. Oil Chem. Soc., 42, 53 (1965)]に従い卵黄ホスファチジルコリン(Egg PC)を抽出し、アルミナカラムを用いて精製した。その純度はTLCにより確認した。また、2,3-ジアミノプロピオン酸から特開昭61-267

509号公報〔砂本順三ら、日本化学会誌、1987(3)、p569-574〕記載の方法により、DDPCを合成した。上記EggPCの10.6mgとDDPCの7.0mgとを混合し、ナス型フラスコ中で2mlのクロロホルム中に溶解させた。ロータリーエバボレーターを用いてクロロホルムを減圧下に留去し、更に減圧デシケーター中で一夜放置した。次いで得られた液をボルテックスミキサー上でPBS(pH7.38)の1mlに膨潤させ、攪拌した。その後、UR200Pプローブ型超音波破碎機(トミー社製)を用いて、窒素ガス気流下に5分間、0℃、25Wで超音波照射して、所望のリボソーム懸濁液を得た。

【0022】実施例2 牛蛙舌上蛋白質の抽出：牛蛙に麻酔(ウレタン麻酔)を施し舌を口腔内より引き出し味覚感知面を上にして固定する。続いて1ml中にDDPC:DMPG=4:6の脂質5mgを含むリボソーム水溶液10mlをスポイドにより舌上に添加し、舌の裏でこの溶液をシャーレにより受けこの溶液をスポイドで吸い舌上に添加する操作を1時間繰り返し行ない舌上味覚閾と蛋白質の再構築したリボソーム懸濁液を得た。

【0023】実施例3 舌上蛋白質抽出用リボソームの効果：牛蛙の舌咽神経に銀・塩化銀電極を繋ぎ味覚応答変化を神経電位変化として測定し、実施例2に示したリボソーム処理を1時間施した前後で測定値を比較した。その結果を図1～図4に示す。図1及び図2より甘味成分であるシュークロース及び1-アラニンについては、味覚刺激した場合の神経電位変化量が処理前に比べ処理直後では明らかな減少がみられた。続いて得られたリボソーム懸濁液中のリボソームを分離し、リボソーム中の抽出蛋白量を蛍光指示薬(フルラン)を用いて定量した結果、133μg/mlの蛋白質が抽出されていることを確認した。

【0024】実施例4 抽出蛋白質の分析：実施例2に挙げたリボソーム抽出液とリボソーム抽出前に舌を

オン交換水で洗浄し得た蛋白質とをSDS-PAGEにより分析後比較検討した。その結果を図5及び図6に示す。図より、明らかに高分子量(60KD以上)に違いが認められ、リボソーム懸濁液により蛋白質が抽出されていることが判明した。

【0025】実施例5 抽出条件の最適化による味覚の選択的マスキング：一般に、塩・酸・苦味は舌上脂質膜へ作用して発現する味といわれ、他方甘・うま味は舌上に存在すると考えられる受容蛋白質に作用して発現する味であると考えられている。そこで、舌上脂質を傷つけず舌上の受容蛋白質を主に抽出するリボソーム抽出法について実施例2に挙げたリボソームを用い検討を行なった。結果を図7に示す。その結果、抽出時間を30分として抽出を行なえば抽出直後について甘味だけを選択的にマスキングできることが分かった。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例3において、本発明抽出剤の処理前後でL-アラニン刺激した場合の神経電位の変化量を示す図である。

【図2】実施例3において、本発明抽出剤の処理前後でシュークロース刺激した場合の神経電位の変化量を示す図である。

【図3】実施例3において、本発明抽出剤の処理前後でキニーネ塩酸塩刺激した場合の神経電位の変化量を示す図である。

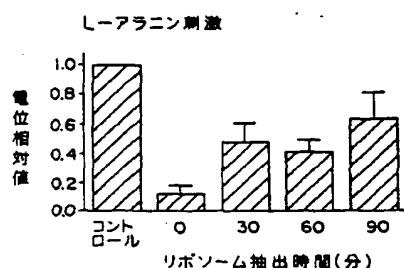
【図4】実施例3において、本発明抽出剤の処理前後でL-ロイシン刺激した場合の神経電位の変化量を示す図である。

【図5】実施例4において、舌をイオン交換水で洗浄して得た蛋白質の分析結果を示す図である。

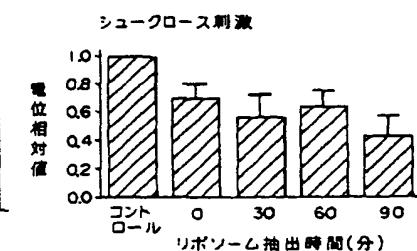
【図6】実施例4において、本発明抽出剤により、抽出された蛋白質の分析結果を示す図である。

【図7】実施例5において、本発明抽出剤による味覚の選択的マスキングの結果を示す図である。

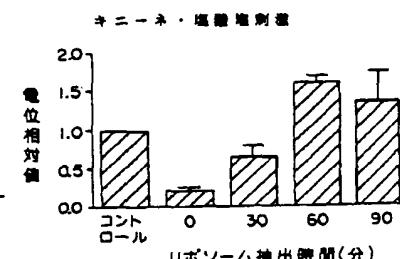
【図1】



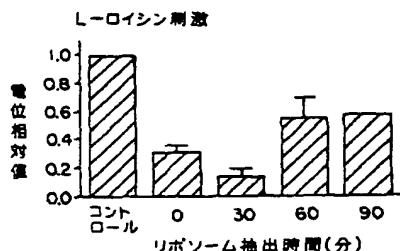
【図2】



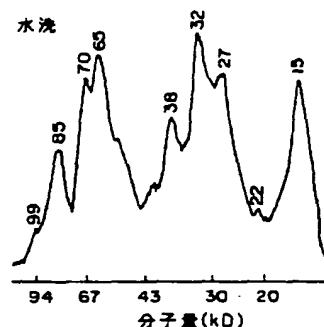
【図3】



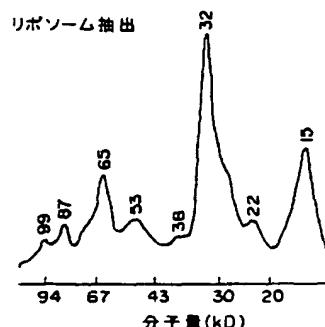
[図 4]



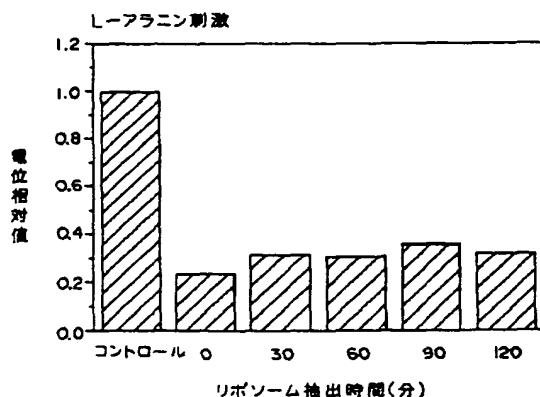
[図 5]



[図 6]



[図 7]



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

